### BIOTINYLATED LABELED COMPOUND AND METHOD FOR FLUORESCENT LABELING USING THE SAME

Publication number: JP7157487 (A)

Also published as:

Publication date:

1995-06-20

P3438927 (B2)

Inventor(s):

SUZUKI OSAMU; ICHIHARA TATSUO; MASUDA GEN;

TAKEZAKI KAZUHISA +

Applicant(s):

NISSHIN SPINNING +

Classification:
- international:

C07D495/04; G01N21/78; G01N33/58; C07D495/00;

G01N21/77; G01N33/58; (IPC1-7): C07D495/04; G01N21/78:

G01N33/58

- European:

Application number: JP19930339727 19931206 Priority number(s): JP19930339727 19931206

#### Abstract of JP 7157487 (A)

PURPOSE: To obtain a new compound useful for fluorescent label DNA probe method for fluorescent label RNA probe method for analyzing a DNA base sequence. CONSTITUTION: A compound of the formula (R1, R2 and R3 are each H, a lower alkyl or a halogen). This compound is obtained by reacting a fluoresceinamine derivative with biotin by a wellknown method for forming a peptide bond. The compound of the formula has detection sensitivity more excellent than that of chemical coloring method, is capable of using and storing streptavidin or avidin separately from a biotinylated fluorescent compound, has excellent stability and excellent reproducibility of fluorescent detection. Being simply synthesized, an advantage is inexpensive.: Fluorescent labeling can be carried out by (1) a process for labeling a DNA or an RNA with biotin, (2) a process for reacting the DNA or the RNA labeled by biotin with streptavidin or avidin and (3) a process for reacting the complex obtained by the process (2) with the compound of the formula.

Data supplied from the espacenet database — Worldwide

(11)特許出願公開番号

【特許請求の範囲】

特開平7-157487

技術表示箇所

(43)公開日 平成7年(1995)6月20日

33/58	G01N 21/78	C07D 496/04	(51) Int.Cl.*
Z	c	103	機別記号
			疗内整理番号
			F I

## 審査請求 未請求 請求項の数5 FD (全7頁)

言葉へ	最类页门统人		-	
	(74)代理人 井理士 小林 雅人 (外1名)	(74)代理人		
	制御株式会社東京研究カンター内			
E 基	東京都足立区西新井柴町1-18-1			
	播田 拠	(72)発明者		
	紡績株式会社東京研究センター内			
華	東京都足立区西新井柴町1-18-1			
	市原 竜生	(72)発明者 市原 竜生		
	制御株式会社東京研究センター内			
田華	東京都足立区西新井柴町1-18-1 日滑			
	第十 及	(72)発明者		
(番)1号	東京都中央区日本橋人形町2丁目31番11号		平成5年(1983)12月6日	(22)出版日
	日補紡織株式会社			
	000004374	(71)出額人 000004374	<b>特膜平</b> 5-339727	(21)出願番号

# (54) 【発明の名称】 ガオチン化療機化合物及びそれを利用した蛍光療機化方法

識化方法を提供する。 なるビオチン化標識化合物、及びそれを利用した蛍光標 られ、合成法も節便であるため安価に大品調製が可能に ており、使用操作も簡便であり、再現性の高い結果が得 合物を別々に使用・保存可能であるため、安定性に優れ ストレプトアビジン又はアビジンと、ビオチン化蛍光化 化学発色検出よりも優れた検出感度を有し、

【構成】

工程を含む。 と、上記式(1)ビオチン化標識化合物とを反応させる ジンとを反応させる工料; (3) (2) で得た複合体 したDNAXはRNAと、ストレプトアビジン又はアビ 又はRNAを標識する工程;(2)ビオチンにより標識 又この蛍光標識化方法は、(1)ビオチンによりDNA ンを表す)で表わされるビオチン化標識化合物であり、

(式中、R1乃至R3は水素、低級アルキル基又はハロケ

[14] 【加求班】 式(1)

8

5

護化合物。 ンを表す)で表わされることを特徴とするビオチン化標 (式中、R:乃至R:は水点、低級アルキル基又はハロゲ

で表わされることを特徴とする請求項1に記載のビオチ ン化標纖化合物。 【請求項3】 式(1-2)

で表わされることを特徴とする請求項1に記載のビオチ 【請求項4】 式(11)

8

特開平7-157487

8

ンဂ藤護先合物: で表わされることを特徴とする請求項1に記載のビオチ

識する工程;(2)ビオチンにより標識したDNA又は 護化方法;(1)ビオチンによりDNA又はRNAを標 【化5】 せる工程; (3) (2) で得た複合体と、式 (1) RNAと、ストレプトアビジン又はアビジンとを反応さ 【請求項5】 次の工程を含むことを特徴とする蛍光標

させる工程。 ンを表す)で表わされるビオチン化標識化合物とを反応 (式中、R:乃至R:は水素、低級アルキル基又はハロゲ

### 【発明の詳細な説明】

[1000]

識化方法に関するものである。 物、及び、このピオチン化標識化合物を利用した蛍光標 るための蛍光ラベルDNAプローブ法や蛍光ラベルRN A プローブ法に用いて有用な新規なビオチン化標識化合 【産業上の利用分野】本発別はDNA場場配列を解析す

[0002]

40

合するようにした前記標識プローブによって、目的の核 み二本鎖を形成するため、解析対象の塩基配列のみに続 プローブが結合しうる特定の塩基配列を有する核酸との に検出可能な標識物質を結合した標識プローブは、標識 質を利用すると、核酸の一方の鎖に、化学的又は物理的 素結合により核酸は二本鎖を形成する。従って、この性 遺伝子情報が特定され、GとC、AとT(又はU)の水 【従来の技術】遺伝情報を担う核酸は、G、C、A、T (又はU)の塩基を持ち、これら塩基の配列にり個々の

6

特開平7-157487

酸を検出することができる。

棄物処理などに問題があった。 出が可能であるものの、使用操作の安全性、経済性、廃 (RI)を標識物質として使用する方法は、高感度の核 【0003】このような方法の内、ラジオアイソトーブ

と結合させるものである。 の結合特別性を利用する方法がある。即ち、修案又は蛍 して、特定の塩基配列を有する核酸に結合したビオチン 光物質で標識したストレプトアビジン又はアビジン使用 ものに、ビオチンと、ストレプトアビジン又はアビジン **識方法の探索が従来から進められており、その代表的な** 【0004】このため、R I に代るべき標識物質又は標 10

[0005]

るため、解析対象の核酸を大量に確保しなければならな **う化学発色検出であり、検出感度が蛍光検出に比べて劣** 素熱質の場合は、基質の格素分解物が色素洗消するとい 【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記酵

安価かつ筒便に実施できることを見出し、本発明を完成 オチン化標識化合物を用いることにより、安定性良く、 て永年に亘り鋭意研究を行なった結果、本願の新規など の化合物を安価に大量に調製することは困難であった。 め、溶液状態での長期保存ができず、核酸の解析におい はアビジンと蛍光仏素との化合物が安定性に欠けるた て再現性の良い結果を得るのは困難であり、しかも、こ た核酸を検出するものであるが、ストレプトアビジン又 を照射して発する蛍光により、複合体が間接的に結合し 【0007】本発明の発明者らは、核酸の検出法につい 【0006】一方、蛍光物質の場合、蛍光色素の励起光 20

用いればプロープに蛍光標識をすることができ、これに トアビジン又はアビジンに、更にビオチンが結合するこ た標識及び標識方法について鋭意研究を行ない、ビオチ ストレプトアビジン又はアビジンの結合特異性を利用し とができることから、蛍光化合物を結合したビオチンを ン標識したプローブのビオチン部分に結合したストレブ 【0008】即ち、本発明の発明者らは、ビオチンと、

- (1) 化学発色検出よりも優れた検出感度を有し、
- に優れており、使用操作も簡便であり、再現性の高い結 蛍光化合物を別々に使用・保存可能であるため、安定性 果が得られる。 (2) ストレプトアビジン又はアビジンと、ビオチン化 40
- なることを見出し、本発明を完成させたものである。 (3) 合成法も簡便であるため安価に大量調製が可能に

上標識化合物は、式 【課題を解決するための手段】本発明の新規なビオチン

と、ストレプトアビジン又はアビジンとを反応させるI 程: (3) (2)で得た複合体と、式 又、このビオチン化標識化合物による蛍光標識化方法 【化7】 工程;(2)ビオチンにより標識したDNA又はRNA ンを表す)で表わされることを特徴とするものであり、 (式中、R, 乃至R, は水素、低級アルキル基又はハロゲ (1) ビオチンにより DNA XはRNAを拡張する

させる工程を含むことを特徴とするものである。 ンを表す)で表わされるビオチン化標識化合物とを反応 【0010】次に本発明を詳細に説明する。 (式中、R:乃至R:は水素、低級アルキル基又はハロゲ

ミン誘導体におけるアミノ基の位置により、例えば式 とドオチンとが結合したものであり、フルオフセインア (1) に則らかなように、フルオフセインアミン誘導体 【0011】本発明のビオチン化標識化合物は、上記式

[化8] (1-1)

で表わされるものや、式(I-2)

【0012】更に、本発明のビオチン化標識化合物にお で表わされるものが包含される。

これは、レラオフセインに災性体が存在するのと回答。 上記式(1)で表されるもののほかに、例えば式(1

3

94 84 89

で表わされるものも存在する。

ロゲン原子、即ち弗素原子、塩素原子、臭素原子又は沃 炭素数1乃至6の直鎖又は分枝鎖アルキル基、又は、ハ ル、ブチル、インブチル、ペンチル、ヘキシルのような 素原子、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピ 素原子を表している。 【0013】上記各式における置換基R:乃至R:は、水

【0014】尚、本発明のビオチン化標識化合物は、分

特開平7-157487

3

体児性体が存在するが、その各々、或いはそれらの混合 物のいずれも本発明に包含される。 子内に不斉炭素を有し、各々がR配位、S配位である立

結合を生成する公知の方法によって反応させるのであ フルオレセインアミン誘導体とビオチンとを、ペプチド 次のような方法によって製造することができる。即ち、 【0015】一方、本発明のビオチン化標識化合物は、

6 る方法や縮合剤を使用する方法を適宜に採用することが ステルーアミド交換反応、ビオチンのカルボン酸部分を 等)に変換し、フルオレセインアミン誘導体と反応させ 活性化された酸残基(例えば、酸ハライド、酸無水物 【0016】ペプチド結合を生成する反応としては、

の存在又は非存在下に反応させればよい。 ロトン性極性溶媒に溶解し、縮合剤を使用し、有機塩基 【0017】 総合剤を使用する方法では、化合物を非プ

20 でき、更に好適には、N,N-ジメチルホルムアミドで ロトリアミドのようなアミド類;ジメチルスルホキシ リドン、N-メチルピロリジノン、ヘキサメチルホスホ 類:ホルムアミド、N,N-ジメチルホルムアミド、 セトニトリル、イソプチロニトリルのようなニトリル が、好適には、蟻酸エチル、酢酸エチル、酢酸プロピ 発物質をある程度溶解するものであれば特に限定はない る非プロトン性極性溶媒としては、反応を阻害せず、出 ド、スルホランのようなスルホキシド類を挙げることが N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチル-2-ピロ ル、酢酸プチル、炭酸ジエチルのようなエステル類:ア 【0018】上記縮合剤を使用する反応の際に使用され

はないが、好適には、トリエチルアミン、トリプロピル C)のようなカルボジイミド類や2- (1H-ベンゾアリ において塩基として使用されるものであれば、特に限定 な第3級アミンである。 アミン、トリプチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ジシクロヘキシルアミンのような有機塩基類を挙げ 挙げることができ、好適には、HBTUである。 ウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU)を アゾールー1ーイル) -1, 1, 3, 3ーテトラメチル 結合を生成する方法に通常使用されているものであれば ることができ、更に好適には、トリエチルアミンのよう よいが、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DC 【0020】使用される有機塩基としては、通常の反応 【0019】又、使用される縮合剤としては、ペプチド

40

なるが、通常は、室温において数日間程度である。 化合物、反応試薬又は使用される溶媒の種類によって異 【0021】反応温度及び時間は、主に反応温度、原料

物は、消法に従って、反応混合物から単雌される。 【0022】反応終了後、本発明のビオチン化標識化合

50 [0023]

9

【発明の効果】本発明のピオチン化標識化合物は、簡便に合成できるので安価であり、又、経時的に安定な化合物であるので蛍光検出の再現性は良好で、保存性に優れている。

[0024]

【実施例】以下に、実施例をあげて本発明を更に具体的 に説明する。

【0025】実施例1

わす) 0. 23gを引た (収率40%)。 わされる目的化合物(以下、化合物(1)のようにも表 化メチレン/メタノール=5/1、次に、クロロホルム をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(流出溶媒:塩 チルで抽出し、有機層を乾燥後、溶媒を留去した。残渣 飽和食塩水を加えて析出した結晶を濾別し遮液を酢酸エ オロホスフェート 0.5 7 g の乾燥ジメチルホルムアミ 弊した。2-(1 H-Հソントコアゾーカー 1 -イラ) 35gを、乾燥したジメチルホルムアミド16m1に溶 /メタノール=2/1)で精製し、以下の式(1)で表 14m1を加えて、完温で3日間反応させた。反応液に ド (8 m 1) 溶液を加え、更に、トリエチルアミンO. -1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフル ビオチン0.24g及び5ーアミノフルオレセイン0 20 10

融点:238℃(分解)

\*H-NMRスペクトル (DMSO-d6、ppm, 6):1.35~1.75(6H, m)、2.39(2H, t)、2.59(1H, d)、2.84(1H, dd)、3.16(1H, m)、4.16(1H, m)、4.31(1H, m)、6.37(1H, s)、6.4 406(1H, s)、6.50~6.64(6H, m)、7.18(1H, d)、7.81(1H, d)、8.34(1H, s)、10.15(1H, bs)、10.35(1H, s)、300、1685、1636、1605、1591、1459、1294、1272

【0026】 [核酸の検出] マウス戦下腺NGF (神経成長因子) のcDNA (0.35Kb) をテンプレートとして、ランダムプライマー法でどオチン熱議DNAプローブを合成した。このプローブを用い、マウス類下腺 50

組織切片に対して、ハイフリダイゼーション (insitu) を行なった。ハイフリダイズした後、スキムミルクでプロッキングし、ストレプトアビジン1 μ g を務加し、0.1Mかリス塩酸 (p H 7.5)、0.1M食塩水、0.05%T r i ton X - 100で洗浄した。遊光下、100で洗浄した。送光下、上記合成したビオテン化フルオレセイン (1)を1%含む30%ジタルホルムアミドー25mMリン酸ナトリウム緩衝液5 μ 1を添加し、1時間放置した後、50%メタノール、0.1Mリン酸ナトリウム水溶液(p H 7.5)で洗浄した。80%グリセロールで組織切片を封入し、蛍光顕微波で観察してマウス顕下腺組織に特度的なシグナルを得た。合成した化合物の溶液を、遮光下突温で30日放置した後、同模な操作でマウス頸下腺組織に特異的なシグナルを同様に得た。

【0027】 火焰倒2 四番@1 アゼンアー 6ーアミノフルオト

実施例 1 において、6 ーアミノフルオレセインを、5 ―アミノフルオレセインを、 5 ―アミノフルオレセインの代わりに用いて実施し、以下の式(2)で表わされる目的化合物を200mg得た。【化12】

題点:195°C(分解)

8

ಆ

'H-NMRXベクトル (DMSO-d6, ppm, δ):1. 35~1. 75 (6H, m)、2. 40 (2 H, t)、2. 58 (1H, d)、2. 82 (1H, d d)、3. 20 (1H, m)、4. 18 (1H, m)、4. 32 (1H, m)、6. 38 (1H, s)、6. 4 7 (1H, s)、6. 50~6. 70 (6H, m)、7. 42 (1H, s)、7. 74 (1H, d)、8. 10 (1H, d)、10. 32 (1H, s)、10. 70 (1H, d)、10. 32 (1H, s)、10. 70 (1H, bs)

赤匁吸収スペクトル(KBr、cm<sup>1</sup>):3300、1 689、1635、1607、1593、1460、1 295、1272

【0028】 [核酸の検出] マウス類下腺NG下の特異的抗体をウサギより調整し、これにストレプトアビジンを結合させた。マウス生体内から取り出した類下腺をサッカローズ等で固定後、マウス類下腺のパラフィン切片を作製し、キンレンによる脱水ラライン、アルコールとよる脱水などの組織切片 ii 処別をした。次いで、10%スキムミルクで、組織切片への抗体の非特異的吸着を防スキムミルクで、組織切片への抗体の非特異的吸着を防スキムミルクで、組織切片への抗体の非特異的吸着を防スキムミルクで、組織切片への抗体の非特異的吸着を防

ぐためにプロッキングし、NGF抗体-ストレプトアピップを認識した。過剰のNGF抗体-ストレプトアピシップを認識した。過剰のNGF抗体-ストレプトアピシンを洗浄験式し、上記合成した化合物(2)を1%合む、30%ジメチルホルムアミド-25mMリン酸ナトリウム緩衝機5µ1で機識し、組織に特異的なシグナルを得た。合成した化合物の溶液を、遮光下室温で30円を得た。合成した化合物の溶液を、遮光下室温で30円放置した後、同様な操作でマウス類下原組織に特異的なシグナルを同様に得た。

【0029】 火藤例3 実施例1において、5'ーアミノー2、7ージメチルフ 実施例1において、5'ーアミノー2、7ージメチルフ ルオレセインを、5ーアミノフルオレセインの代わりに 用いて実施し、以下の式(3)で表わされる目的化合物 を180mg得た。

(化13)

9

20

融点:220℃(分解)

'H-NMR X Δ Þ Þ Þ (DMS O - d6, ppm, δ): 1.34 ~ 1.73 (6 H, m) 、2.35 (6 H, s) 、2.40 (2 H, t) 、2.58 (1 H, d) 、2.80 (1 H, dd) 、3.20 (1 H, m) 、4.18 (1 H, m) 、4.32 (1 H, m) 、6.38 (1 H, s) 、6.44 (1 H, s) 、6.60 (2 H, s) 、6.88 (2 H, s) 、7.20 (1 H, d) 、7.90 (1 H, d) 、8.32 (1 H, s) 、10.15 (1 H, b) 、10.40 (1 H, s)

赤外吸収スペクトル(KBr、cm<sup>1</sup>):3312、1690、1632、1610、1590、1455、1291

8

特開平7-157487

ම

m1を添加し、0.1Mトリス塩酸(pH7.5)、
0.1M食塩水で洗がした。選光下、0.1M小リス紅酸(pH7.5)、0.1M食塩水、2mM塩化マグネ酸(pH7.5)、0.1M食塩水、2mM塩化マグネシウム、0.05%TritonX~100溶液1m1に、上記合成した化合物(3)を1%含む30%ジメチルホルムブミドー25mMリン酸ナトリウム緩衝液5μ1を加えた溶液で標準し、暗所で1時間放置後90%エタノール、70%エタノール、50%エタノール、0.1Mトリスー塩酸一0.1M食塩で洗がした。強光顕微10銀で観察して組織に特異的なシグナルを得た。合成した化合物の溶液を、選光下室温で30日放置した後、同様な操作でマウス頸下腸組織に特異的なシグナルを同様に得た。

【0031】実施例4

ゾ施例! において、5' ーアミノー2、7 -ジプロモー9、12 - ジイオドフルオレセインを5 - アミノフルオレセインの代わりに用いて実施し、以下の式(4)で表しされる目的化合物を1 2 5 m g 得た。

3

融点:220℃ (分解)

ಜ

H-NMRX<br/>
b) H-NMRX<br/>
b) H 35~1. 72 (6H, m) 2. 40 (2 H, 1) 2. 60 (1H, d) 2. 85 (1H, d) d) 3. 12 (1H, m) 4. 18 (1H, m) 4. 30 (1H, m) 6. 37 (1H, s) 6. 4 6 (1H, s) 7. 40 (1H, s) 7. 45 (1H, d) 7. 80 (1H, d) 8. 35 (1H, s) 10. 15 (1H, bs) 10. 35 (1H, s) 10. 35 (1H, s) 10. 15 (1H, bs) 10. 35 (1H, s) 10. 35

赤冬吸収スペクトル(KBr、cm<sup>1</sup>):3308、1695、1640、1608、1590、1465、1295、1271

【0032】 「核酸の検出」やウスNGFーC DNAをテンプレートにしてランダムプライマー法でディゴギシゲニン線画した DNAプローブを調整した。マウス頭下 解語線別片を、LEDNAでハイブリダイゼーション (Institu) を行なった。ハイブリダイズした後、スキム ミルクでプロッキングし、ディゴギシゲニン抗体ースト

50

(7) 特開平7-157487 12

11 レプトアビジンで標識した。0. 1Mトリス塩酸-0. 1M食塩で洗がし、上記合成した化合物(4)1%を含む、30%ジメチルホルムアミド-25mMリン酸ナトリウム級衝液5μ1で標識し、組織に特異的なシグナル\*

\* を得た。合成した化合物の溶液を、遮光下室温で30日 放置した後、同様な操作でマウス類下原組織に特別的なシグナルを同様に得た。

フロンドページの続き

(72)78則片 竹崎 和久 東京都足立区西新井栄町1-18-1 日清 紡績株式会社東京研究センター内